

Мама пробанда (образец №1) и пробанд (образец №2) являются носителями гетерозиготного аллели (Gly735Glu). Возможно, родной брат пробанда была носителем гомозиготных аллелей (Gly735Glu), и умер от гломерулонефрита в возрасте 12 лет. Следует отметить, что у мамы пробанда (образец № 1) легкая форма течения заболевания, чем у пробанда. Этот факт можно объяснить тем, что только у около 75% заболевших женщин с X-сцепленной формой в конечном итоге развивается протеинурия; хроническая почечная недостаточность (ХПН) развивается примерно у 15% женщин в возрасте 40 лет и около 30% в возрасте от 60 лет [10]. Другими словами, фенотипическая экспрессия X-сцепленных форм у женщин сильно зависит от случайных инактиваций в X-хромосоме.

Так как мутации в гене COL4A5 приводит к изменениям  $\alpha$ -цепи коллагена IV типа, обнаруженная нами замена аминокислоты (Gly735Glu) возможно находится в функционально значимой части гена. В результате можно предположить, что мутация Gly735Glu возможно является патогенной и ассоциирована с ювенильным типом наследственного нефрита, для которого характерно ранее развитие ХПН (до 16 лет).

Нами планируется продолжение исследований полиморфизмов в гене COL4A5 у других членов семьи и проведение корреляционного анализа фенотипических проявлений синдрома Альпорта и генетических характеристик.

#### Литература

- 1 Billy G. Hudson, Karl Tryggvason, Munirathinam Sundaramoorthy et al. Alport's Syndrome, Goodpasture's Syndrome, and Type IV Collagen // N Engl J Med. - 2003. - vol. 348. - P.2543–56.
- 2 Clifford E. Kashtan. Familial hematuria // Pediatr Nephrol. - 2009. - vol.24. -P.1951–1958.
- 3 J. Philippe Jais, B. Knebelmann, I. Giatras, M. de Marchi et al. X-linked Alport Syndrome: Natural History in 195 Families and Genotype- Phenotype Correlations in Males // J Am Soc Nephrol. - 2000. - vol.11. - P.649–657.
- 4 Spear GS, Slusser RJ. Alport's syndrome emphasizing electron microscopic studies of the glomerulus // Am J Pathol. - 1972. - №2. - 213–24.
- 5 Dominic C. Glomerular pathology in Alport syndrome: a molecular perspective // Pediatr Nephrol. - 2012. - №6. - P.885–890.
- 6 Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen // N Engl J Med. – 2003. 348: - P.2543–2556.
- 7 LeBleu VS, Macdonald B, Kalluri R. Structure and function of basement membranes // Exp Biol Med (Maywood). – 2007. 232:- P.1121–1129.
- 8 Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV // Microsc Res Tech. – 2008. 71: - P.357–1370
- 9 Deltas C., Pierides A., Voskarides K. The role of molecular genetics in diagnosing familial hematuria(s) // Pediatr Nephrol. – 2011. published online
- 10 Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Gross O, Netzer KO, Flinter F, Pirson Y, Dahan K, Wieslander J, Persson U, Tryggvason K, Martin P, Hertz JM, Schroder C, Sanak M, Carvalho MF, Saus J, Antignac C, Smeets H, Gubler MC. X-linked Alport syndrome: natural history and genotype-phenotype correlations in girls and women belonging to to 195 families: a “European Community Alport Syndrome Concerted Action” study // J Am Soc Nephrol. -2003. - №4. - P.2603–2610.

УДК 616.981.42

Ш.А. Барамова\*, Е.К. Оспанов, Б. Шманова, А.А. Адамбаева, Н. Мәтіхан  
 ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт», г. Алматы, Казахстан  
 \*e-mail:sholbar@mail.ru

#### Активность бактериофагов выделенных из культур бруцелл in vitro

Установлено, что под воздействием индуцирующего фактора пенициллина бруцеллы переходят в лизогенное состояние и выделяют специфически фаги, которые после очистки и концентрирования повысили свою литическую активность.

**Ключевые слова:** бактериофаг, полиэтиленгликоль, пенициллин

Ш.А.Барамова, Е.К. Оспанов, Шманова Б. Адамбаева А.А., Мәтіхан Н.

#### Бруцелла өсінділерінен in vitro бөлініп алынған бактериофагтардың белсенділігі

Жүргізілген жұмыстың нәтижесінде бруцеллаларға пенициллинмен әсер ете отырып олардан фаг бөлініп алынды, одан кейін тазаланып және қоюландырылып литикалық белсенділігін жоғарылаттық.

**Түйін сөздер:** бактериофаг, полиэтиленгликоль, пенициллин

Sh.Baramova, Y.Ospanov, B.Shmanova, A. Adambayeva N.Matikhan

#### **Activity of bacteriophages isolated from cultures of brucellosis in vitro**

Confirmed that under the influence of induced factor penicillin on brucellas changes to lysis condition and allocates special phages, which are after cleaning and concentration made higher their lytic activity.

**Keywords:** bacteriophage, polyethylene glycol, penicillin

Среди множества испытанных препаратов, в том числе и новейших антибиотиков еще не нашлись средства, способные решить проблему бруцеллеза. Предложенные средства специфической терапии некоторыми авторами при последующей их проверке другими исследователями не подтверждали надежности успеха в лечении.

В этой связи мы решили испытать бруцеллезные фаги, так как фаготерапия является одним из известных способов воздействия на микробов. Дрожевкина М.С. и др. сообщают, что есть определенная закономерность в нарастания титра бактериофага и одновременном улучшений состояния больных [1]. Улучшение состояния и выздоровление сопровождалось повышением титра литической активности бруцеллезного фага в крови до  $10^6$ - $10^9$ , глубокой изменчивостью культуральных и антигенных свойств возбудителя в сторону R-форм. При этом по силе литического действия и титрам этот бактериофаг был различен как у отдельных больных, так и у одного и того же больного при повторном исследовании. Следовательно, эффективность использования бактериофагов для терапии и профилактики инфекционных болезней во многом может, зависит от его литической активности, спектра действия, а также способа и кратности введения, периода персистенции, сроков применения фагов от начала заболевания, взаимоотношения фага и макроорганизма.

Поэтому целью наших исследований являлось получение вирулентного поливалентного бруцеллезного фага, обладающего широким спектром литической активности в отношении бруцелл различных видов.

#### **Материалы и методы**

Специфически бруцеллезный фаг изолировали из свежeweделенной эпизоотической культуры *B.abortus*: №11(00141687), используя индуцирующий фактор пенициллин, и определили активность по отношению к различным штаммам *in vitro* [2].

Для этого культуру бруцелл выращивали в жидкой питательной среде с последовательно увеличиваемыми концентрациями пенициллина от 10 до 3000 и более ЕД. антибиотика в 1,0 см<sup>3</sup> среды, до перехода бактерий в слизистое состояние. Затем культуру бруцелл инкубировали в питательном бульоне без антибиотика при 37 °С. Через 3-4 суток бульонную лизогенную культуру бруцелл подвергали фильтрации через керамический фильтр с диаметром пор 100-150 нм и в фильтрате определяли наличие фага, нанося каплю фильтрата на газон с индикаторной культурой бруцелл вакцинного штамма *B.abortus* 19. Репродукцию фагов осуществляли на этом же штамме бруцелл согласно методике, разработанной Л.В. Ляпустиной со авторами [3].

Для повышения активности бактериофага использовали полиэтиленгликоль, высокомолекулярный полимер с молекулярной массой 6000[4]. Литическую способность выделенного фага определяли по отношению к различным видам бруцелл, готовили 2 млрд. взвесь затем каждую культуру растирали ватным тампоном по поверхности агара узкой полоской от одного края чашки до другого, проводя параллельные дорожки. После наносили бактериофаг каплями и через час ставили в термостат при температуре 37 °С, на 2-3 сутки появлялись стерильные пятна на месте нанесения фага.

#### **Результаты и их обсуждение**

В результате лизогенизации из эпизоотической культуры *B.abortus*: № 11(00141687) были выделены специфические фаги. При этом первоначальный титр выделенных фагов был низким, лизис вакцинного штамма *B.abortus* 19 наблюдали в разведении  $10^4$  в 1 см<sup>3</sup> МПБ. Однако после 2-3 пассажей на чувствительной культуре диапазон литического действия фагов мог усиливаться, предельный титр повышался до  $10^9$ , и редко до  $1 \times 10^{11}$  БОЕ/мл.

Для этого взвесь культуры штамма *B.abortus* 19 концентрацией  $\approx 10^9$  БОЕ/см<sup>3</sup> в бульоне Мартена, дополнительно содержащем серноокислый кальций и магний в концентрации  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  М каждой выращивали при 37 °С в течение 5-6 часов. Затем смешивали 0,1 см<sup>3</sup> взвеси и 0,1 см<sup>3</sup> бруцеллезного бактериофага с концентрацией  $10^4$  БОЕ/см<sup>3</sup>. Смесь выдерживали при 37 °С 20-30 минут, после чего перенесли в 100 см<sup>3</sup> бульона Мартена и выращивали в течение 24-36 часов при 37 °С. Центрифугировали 20 минут при 8000 об/мин, фильтровали через керамический фильтр и в

фильтрате определяли титр фага путем нанесения капли последовательно разведенного фильтрата на газон с индикаторной культурой – штамм *B.abortus* 19. Затем чашки Петри с посеянной индикаторной культурой помещали в термостат при 37 °С на 3-4 суток. Через указанный период просматривали посева и устанавливали титр фага. Концентрация полученного бактериофага составило  $1 \times 10^{11}$  БОЕ/см<sup>3</sup>.

Спектр литического действия выделенного бактериофага оценивали по его способности лизировать различные штаммы бруцелл на твердых средах, в качестве индикаторных, использовали штаммы: *B.abortus* 19, 960, 82, 544; *B.melitensis* 16М, Н-12, 565; *B.suis* 1330, *B.ovis* 10/2, 63/290; *B.canis* 1066. Из них к S-форме относятся штаммы: 19, 544, 16М, 565, 1330; SR- 82 и к R- 16/4, Н-12, 1000, 10/2, 424/2, 63/290, 1066. Данные о литическом диапазоне выделенного фага в сравнение с референтным бруцеллезным фагом ТБ представлены в таблице 1.

**Таблица 1** - Спектр литического действия бруцеллезного фага выделенного из *B.abortus*: №1(00141687)

Бактериофаги	Штаммы бруцелл и степень изменчивости										
	<i>B.abortus</i>				<i>B.melitensis</i>			<i>B.suis</i>	<i>B.ovis</i>		<i>B.canis</i>
	19	960	82	544	16М	Н-12	565	1330	10/2	63/290	1066
	S	R	SR	S	S	R	S	S	R	R	R
ТБ	сл		сл	сл				сл			
Испытуемый	сл	сл	сл	сл	сл	сл	сл	сл	сл	сл	сл

Как видно из таблицы 1 фаг, выделенный из *B.abortus*: № 11(00141687) лизирует все взятые в опыт штаммы бруцелл разных видов, в отличие от бактериофага ТБ, образующего негативные колонии только на штаммах *B.abortus* и *B.suis*, находящихся в S-форме. Подобные результаты были получены Н.Ф.Зенковой [5]. Большинство выделенных ею фагов лизировали штаммы двух (*B.melitensis*, *suis*) или даже всех трех видов бруцелл, то есть также не было отмечено строгой типоспецифичности действия полученных рас фагов.

Далее для получения концентрированного бактериофага исходный фагосодержащий материал в количестве 50,0-100,0 см<sup>3</sup> внесли в диализный мешочек, концы завязали, затем перенесли в кювет и сверху засыпали ПЭГ-6000 из расчета 10-15% к общему объему исследуемой жидкости, после выдерживали при комнатной температуре до полного выхода из диализного мешка жидкой части суспензии. В мешочке оставались концентрированные сгустки бактериофага, его смыли бульоном Мартена в соотношении 20:1 соответственно. В результате нам удалось в течение 10-20 часов получить 50-кратные фаговые концентраты.

Таким образом, нами получен поливалентный бруцеллезный фаг с широким спектром литического (*in vitro*) действия в отношении бруцелл различных видов. Полученные экспериментальные данные по изучению чувствительности бруцелл к бактериофагам могут являться основанием для продолжения исследований по определению возможности применения их для санации организма животных от возбудителя бруцеллеза.

#### Литература

- 1 Самсыгина Г.А., Бони Е.Г. Бактериофаги и фаготерапия в педиатрической практике //Педиатрия.- 1984- № 4. С.7-71.
- 2 Воробьев А.Л. Зависимость литического спектра бруцеллезных фагов от индуцирующего фактора //Профилактика и ликвидация заболеваний сельскохозяйственных животных бруцеллезом и туберкулезом в Казахстане: Сборник научных трудов КазНИВИ. – Алматы.- 1989. - С.30-35.
- 3 Пат. 2126833 Российская Федерация, МКП С12N7/00. Способ получения бруцеллезного бактериофага/Ляпустина Л.В., Лямкин Г.И., Таран И.Ф.; заявитель и патентообладатель Ставропольский науч.-исслед. противочумный ин-т - № 97118077/13; заявл. 21.10.1997; опубл. 27.02.1999.
- 4 Ин. пат.26571 Республика Казахстан, МПК А61К 39/10 (2006.01), А61Р 31/04 (2006.01), С12N 7/02 (2006.01). Способ очистки и концентрирования бруцеллезных бактериофагов / Барамова Ш.А., Султанов А.А., Оспанов Е.К.; заявитель и патентообладатель ТОО «Каз.науч.-исслед.вет.ин-т» - № 2012/0654.1; заявл.05.06.2012; опубл.25.12.2012, Бюл.№12.-Зс.
- 5 Зенковой Н.Ф. Бактериофаги у бруцелл, выделенных в Казахстане //Тр. Каз.ин-та краевой патологии.- Т.13.-Алматы.- 1956. - С.17-23.